Diagnostic Significance of the Ratio of Plasma CYFRA 21-1 Autoantibody Immune Complex to Free CYFRA 21-1 in Patients with Colon Cancer

Hong Woo Choi, Heyjin Kim, Ae-chin Oh, Jin Kyung Lee, and Young Jun Hong

Department of Laboratory Medicine, Korea Cancer Center Hospital, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul, Korea

Corresponding author:

Young Jun Hong
Department of Laboratory Medicine,
Korea Cancer Center Hospital, Korea
Institute of Radiological and Medical
Sciences, 75 Nowon-ro, Nowon-gu,
Seoul 01812, Korea
Tel +82-2-970-1261
Fax +82-2-978-2005
E-mail clinchem@kirams.re.kr

Received: July 21, 2020

Revised: September 15, 2020

Accepted: September 16, 2020

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background: The use of plasma autoantibodies associated with cancer as tumor biomarkers has been studied for several decades. We investigated the diagnostic significance of the ratio of CYFRA 21-1-anti-CYFRA 21-1 autoantibody immune complex (CIC), an autoantibody-binding form of CYFRA 21-1, to free CYFRA 21-1 in patients with colon cancer.

Methods: Overall, 50 patients with colon cancer and 120 healthy control subjects were included. Plasma CIC and CYFRA 21-1 levels were measured using a 9G DNA chip (Biometrix Technology Inc., Korea), and the CIC/CYFRA 21-1 ratios were calculated. Data were compared using the Student *t*-test or Mann-Whitney *U*-test. *P*-values <0.05 were considered to indicate statistical significance. We performed receiver operating characteristic curve analysis to determine the optimal CIC/CYFRA 21-1 cutoff ratio for detecting colon cancer.

Results: The CIC/CYFRA 21-1 ratio was significantly higher in the colon cancer group than in the healthy control group (mean±standard deviation, 1.81±0.75 vs. 1.23±0.37; *P*<0.001). The optimal cutoff ratio of CIC/CYFRA 21-1 for detecting colon cancer was 1.40 (area under curve [AUC], 0.749; 95% confidence interval, 0.658–0.839; *P*<0.001), with a sensitivity of 68.0% and specificity of 74.2%. The CIC/CYFRA 21-1 ratio showed higher AUC, sensitivity, and specificity than CYFRA 21-1 or CIC alone.

Conclusions: The plasma CIC/CYFRA 21-1 ratio can be a useful tumor marker in colon cancer.

(Lab Med Qual Assur 2020;42:218-223)

Key Words CYFRA 21-1, CIC, Autoantibody immune complex, Colon neoplasms

서론

Cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1)은 용해성이 있는 사이토케라틴 19 (CK19)의 분절로, 사이토케라틴은 상피세포의 구조적 안정성에 필요한 단백질이며 주된 기능은 세포 사멸을 막는 것이다. CYFRA 21-1은 세포 사멸 시 혈중으로 방출되는 것으로 생각되는데, 그 농도는 종양의 크기와 상관관계를 보인다[1].

CYFRA 21-1은 현재까지 비소세포폐암, 유방암, 자궁경부암, 방광암에서 암표지자로서 많이 연구되었고, 이들의 진단, 예후 예측, 치료효과 예측에 유용함이 밝혀졌다[2-6]. 대장암에서도 CYFRA 21-1이 병기 설정, 양성종양과의 구분, 재발암의 발견에 있어 carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9)보다 우수한 종양표지자로 보고되기도 하였다[7]. 다만 대장암 선별검사로써 CYFRA 21-1의 유용성은 아직까지 확

실하지 않다.

자가항체는 자가항원에 대해 생성되는 항체로, 자가조직에 대해 면역체계의 공격을 유도하여 자가면역상태를 유발하는 항체이다[8]. 암과 연관된 자가항체는 40여 년 전에 최초로 검출되었고, 종양세포에 자가면역성을 띄는 물질이 존재한다는 것을 알게 되었으나 그 표적항원이나 항원결정기(epitope)에 대한 정보는 제한적이었다[9]. 이후 여러 연구자들이 다양한 검사법으로 종양 세포에 대한 자가항체를 측정하여 이들이 암진단에 이용될 수 있는 가능성을 제시하였다. 방사면역전기영동법이나 면역침강법 등의 방법에 의해 소화기계 종양과 유방암 환자에서 CEA, p53 등을 표적으로 하는 자가항체가 있음이 밝혀졌고[10-12], 이후 효소면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay) 기법이 개발되면서 유방암, 대장암, 구강암, 위암, 폐암 환자 등에서 p53 자가항체의 진단적 의미에 대해 평가할 수 있었다[13-15]. 그 밖에도 phage-display library를 이용한 혈청학적 분석, SEREX (serological analysis of recombinant cDNA expression cloning), peptide array, protein array 등을 이용하여 여러 자가항체들을 한 번에 대량으로 신속하게 검사 가능한 새로운 방법들이 속속 개발되었다[16]. 현재도 각종 암에서 종양항원, 자가항체, 종양항원-자가항체 면역복합체에 대해서 연구가 진행되고 있으며, 대장암의 조기진단에 유용한 자가항체로 지금까지 보고된 것은 p53, AFP (alpha-fetoprotein), KRAS, Annexin, RAF 등이다[17].

최근 구아닌 9개 분자를 일렬로 결합하여 타겟분석의 민감도, 특이도를 크게 높인 9G DNA chip (Biometrix Technology Inc., Chuncheon, Korea)이 국내에서 개발되었고, 이를 이용하여 저자들은 CYFRA 21-1이 그 자가항체와 결합한 면역복합체(CYFRA 21-1-anti-CYFRA 21-1 autoantibody immune complex, CIC)와 CYFRA 21-1을 각각 측정한 뒤 그 비(CIC/CYFRA 21-1 ratio), 즉 유리형 CYFRA 21-1에 대한 자가항체 결합형 CYFRA 21-1의 비율을 구하면 폐암 환자를 조기 발견하는 데 유용함을 보고한 바 있다[18]. 본 연구에서는 현재까지 조기진단용으로 만족할 만한 민감도, 특이도를 보이는 혈장 표지자가 없는 암종인 대장암에서 CYFRA 21-1의 자가항체 면역복합체(CIC) 및 CIC/CYFRA 21-1 비의 진단적 의미를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상

본 연구는 한국원자력의학원 국가방사선혈액자원은행에 입고된 50명의 대장암 환자 혈장 검체와 120명의 정상인 혈장 검체를 대상으로 하였다. 전자의무기록을 검토하여 대장암 환자의 성별,

나이, 조직학적 결과, 병기를 조사하였다. 본 연구는 한국원자력의학원 기관생명윤리위원회(institutional review board)의 승인을(KIRAMS2018-06-016) 받았다.

2. 측정방법

CIC와 CYFRA 21-1을 측정하기 위해 혈장 검체 10 μ L를 각각의 검출시약에 첨가하였다. CIC 검출시약은 9개의 연속된 구아닌에 상보적인 염기와 결합시킨 항체 CYFRA 21-1 capture antibody (CYFRA 21-1-cAB-DNA)와 CIC에 대한 형광항체인 anti-human-immunoglobulin G-fluorescence bead (anti-human-IgG-FB)를 포함하였다. CYFRA 21-1 검출을 위한 시약은 CYFRA 21-1-cAB-DNA와 CYFRA 21-1에 대한 형광항체인 CYFRA 21-1 detection antibody-fluorescence bead (CYFRA 21-1-dab-FB)를 포함하였다. 이 검출시약에 혈장 검체를 첨가하여 10분간 반응시킴으로써 CIC와 CYFRA 21-1과의 복합체를 각각 형성하게 하였다. 여기에 반응 완충액을 첨가한 후 9개의 연속된 구아닌 염기가 부착된 9G DNA chip에 분주하였다. 교잡반응이 일어나지 않은 복합체들이 제거될 수 있도록 세척액을 첨가하여 세척과정을 거친 후 9G DNA chip을 Biometrix Technology (BMT) reader (Biometrix Technology Inc.)에 스캐닝하여 형광 강도를 측정함으로써 CIC와 CYFRA 21-1 각각의 농도를 측정하였다. 이 농도를 이용하여 CIC/CYFRA 21-1 비를 계산하였다. 이 측정방법은 액체상(solution phase) 내에서 특이도가 매우 높은 복합체를 형성하며 9G DNA chip에 부착되어 있는 9G DNA membrane과 DNA-DNA 교잡반응을 이용하므로 재현성이 매우 좋으며 특이도가 높다[18].

3. 대장암 환자와 건강대조군의 CYFRA 21-1, CIC, CIC/CYFRA 21-1 비 수치 비교

대장암 환자군 50명, 건강대조군 120명을 대상으로 두 군간 CYFRA 21-1, CIC, CIC/CYFRA 21-1 비를 각각 비교하였고 receiver operating characteristic (ROC) 곡선분석을 시행하여 판정기준치를 결정한 뒤 그에 따른 민감도와 특이도를 산출하였다. 또한 CIC/CYFRA 21-1 비의 경우, 대장암 환자군을 나이(60세 미만 및 이상), 성별, 병기(0-2기와 3-4기)에 따라 각각 두 군으로 나누고 이들 간에 차이가 있는지 알아보았다. 환자군 내에서는 CYFRA 21-1과 CIC의 농도도 서로 비교하여 보았다.

4. 통계학적 분석

정규성 검정을 위해 Kolmogorov-Smirnov test를 사용하였고, 자료는 평균±표준편차 혹은 중앙값(범위)으로 나타났다. CYFRA 21-1, CIC, CIC/CYFRA 21-1 비에 대해 대장암 환자군

과 건강대조군으로 나누어 비교하였고, 환자군 내에서는 성별, 나이(60세 미만 및 이상), 병기(0-2기와 3-4기)에 따라 비교하였다. 환자군의 CYFRA 21-1과 CIC 농도도 비교하였다. 비교 대상군 간의 연속변수의 비교는 Student t-test 또는 Mann-Whitney U-test를 사용하였다. 대장암 환자와 건강대조군과의 CIC/CYFRA 21-1 비의 판정기준치를 확인하기 위해 민감도, 특이도, 곡선하면적(area under the curve, AUC)을 구하였다. *P*값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의하다고 판단하였고, 통계분석에는 IBM SPSS ver. 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하였다.

결과

50명의 대장암 환자군과 120명의 건강대조군에 대한 특성은 Table 1에 제시하였다. 대장암 환자군에서 혈장 CYFRA 21-1과 CIC를 비교하였을 때, CIC가 유의하게 높았다(CYFRA 21-1, 0.88 ± 0.55 ng/mL; CIC, 1.77 ± 1.56 ng/mL; *P*=0.009). 대장암 환자군과 건강대조군의 혈장 CIC/CYFRA 21-1 비의 평균±표준편차는 각각 1.81 ± 0.75 와 1.23 ± 0.37 로 나타나 대장암 환자군에서 유의하게 높았다(*P*<0.001). 혈장 CYFRA 21-1과 CIC는 두 군간 유의한 차이가 없었다(Table 2). ROC 분석결과, 대장암 환자를 가장 효과적으로 선별할 수 있는 지표는 혈장 CIC/CYFRA 21-1 비였으며 판정기준치는 1.40(민감도, 68.0%; 특이도, 74.2%; AUC, 0.749; 95% 신뢰구간, 0.658–0.839; *P*<0.001)이었다. 이에 대한 양성예측도는 51.6%, 음성예측도는 84.0%이었다. 반면, CYFRA 21-1과 CIC의 판정기준치는 각각 0.77(민감도, 46.0%;

특이도, 44.2%; AUC, 0.451; 95% 신뢰구간, 0.364–0.539)과 1.02(민감도, 50.0%; 특이도, 51.7%; AUC, 0.562; 95% 신뢰구간, 0.462–0.662)였다(Fig. 1). 대장암 환자군의 혈장 CYFRA 21-1, CIC, CIC/CYFRA 21-1 비를 성별, 나이(60세 미만 및 이상), 병기(0-2기와 3-4기)별로 비교하였으며 모두 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 3). 대장암 환자군의 성별, 나이(60세 미만 및 이상), 병기(0-2기 및 3-4기)에 혈장 CIC/CYFRA 21-1 비의 판정기준치 1.40을 적용하여 나눈 두 군간의 비교에서도 모두 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4).

Table 2. CYFRA 21-1 and CIC levels and CIC/CYFRA 21-1 ratios in the colon cancer group and healthy control group

Variable	Colon cancer patients (n=50)	Healthy control (n=120)	P-value
CYFRA 21-1 (ng/mL)	0.88 ± 0.55	1.15 ± 0.94	0.315
CIC (ng/mL)	1.77 ± 1.56	1.29 ± 1.00	0.199
CIC/CYFRA 21-1 ratio	1.81 ± 0.75	1.23 ± 0.37	<0.001

Values are presented as mean±standard deviation. Values were compared using the Mann-Whitney U-test.

Abbreviation: CIC, CYFRA 21-1-anti-CYFRA 21-1 autoantibody immune complex.

Table 1. Characteristics of the colon cancer patient group and healthy control group

Characteristic	Colon cancer patients (n=50)	Healthy controls (n=120)	P-value
Age (yr)	68 (26–84)	43 (23–64)	<0.001
Sex			0.332
Male	27 (54.0)	55 (45.8)	
Female	23 (46.0)	65 (54.2)	
Stage			
0	1 (2.0)		
I	4 (8.0)		
II	21 (42.0)		
III	16 (32.0)		
IV	8 (16.0)		

Values are presented as median (range) or number (%).

Fig. 1. Receiver operating characteristic curve using plasma CIC/CYFRA 21-1 ratio to discriminate colon cancer and healthy control groups. Area under the curve (AUC) of plasma CIC/CYFRA 21-1 ratio was 0.749 (cutoff, 1.40; 95% CI, 0.658–0.839; *P*<0.001). AUC of CYFRA 21-1 and CIC were 0.451 (95% CI, 0.364–0.539) and 0.562 (95% CI, 0.462–0.662), respectively. Abbreviations: CIC, CYFRA 21-1-anti-CYFRA 21-1 autoantibody immune complex; CI, confidence interval.

Table 3. CYFRA 21-1 and CIC levels and CIC/CYFRA 21-1 ratios according to patient age and sex and stage of colon cancer

Variable	Patient group					
	CYFRA 21-1 (ng/mL)		CIC (ng/mL)		CIC/CYFRA 21-1 ratio	
	Mean±SD	P-value	Mean±SD	P-value	Mean±SD	P-value
Age (yr)		0.070		0.183		0.350
<60 (n=17)	1.02±0.66		2.07±1.53		1.92±0.59	
≥60 (n=33)	0.81±0.48		1.62±1.58		1.75±0.82	
Sex		0.130		0.179		0.593
Male (n=27)	0.78±0.52		1.43±1.30		1.75±0.75	
Female (n=23)	1.01±0.57		2.17±1.77		1.88±0.77	
Stage		0.230		0.093		0.070
Stage 0-II (n=26)	0.79±0.52		1.38±1.22		1.63±0.69	
Stage III-IV (n=24)	0.98±0.58		2.20±1.80		2.01±0.78	

Values are presented as mean±standard deviation. Values were compared using the Mann-Whitney U-test.

Abbreviations: CIC, CYFRA 21-1-anti-CYFRA 21-1 autoantibody immune complex; SD, standard deviation.

Table 4. Characteristics of the colon cancer group according to age, sex, and stage in relation to the cutoff level of the CYFRA 21-1-anti-CYFRA 21-1 autoantibody immune complex (CIC)/CYFRA 21-1 ratio of 1.40

Variable	Colon cancer patients above cutoff level	Colon cancer patients below cutoff level	P-value
Age (yr)			0.117
<60	14 (42.4)	3 (17.6)	
≥60	19 (57.6)	14 (82.4)	
Sex			1.000
Male	18 (54.5)	9 (52.9)	
Female	15 (45.5)	8 (47.1)	
Stage			0.078
Stage 0-II	14 (42.4)	12 (70.6)	
Stage III-IV	19 (57.6)	5 (29.4)	

Values are presented as number (%).

Abbreviation: CIC, CYFRA 21-1-anti-CYFRA 21-1 autoantibody immune complex.

고찰

자가항체는 암 단백질에 노출된 후 환자의 면역체계에 의해 조기에 생성되어 순환하는 것으로 알려져 있으며, 암의 조기발견에 유용한 표지자로서 지속적으로 주목받아 왔다. 또한 해당 항원이 낮은 농도로 존재하더라도 상대적으로 높은 농도로 자가항체가 생성되며, 자가항체들은 단백질분해와 제거가 제한적으로 일어나는 특

징으로 인해 지속적인 혈중농도와 긴 반감기를 가진다[16]. 본 연구에서는 대장암 환자군에서 혈장 CYFRA 21-1과 CIC를 비교하였을 때, 자가항체의 농도를 반영하는 CIC가 CYFRA 21-1보다 유의하게 높았으며, 이는 앞서 언급한 자가항체의 특징으로 볼 수 있다. 대장암 환자군과 건강대조군의 비교 시 CYFRA 21-1과 CIC는 둘 다 유의한 차이를 보이지 않았지만, CIC/CYFRA 21-1 비는 건강대조군과 비교해 환자군에서 유의하게 증가하였다. 이 또한 암 환자에서 종양표지자에 비해 그에 대한 자가항체가 더 예민하게 반응하는 것을 반영한다. CIC/CYFRA 21-1 비의 경우, 저자들의 폐암 환자에 대한 이전 연구에서도 CIC/CYFRA 21-1 비가 건강대조군과 비교해 환자군에서 증가하였고 폐암 환자를 선별하는 데 있어 CYFRA 21-1을 단독으로 사용했을 때보다 CIC의 민감도와 특이도가 모두 높았으며, CIC/CYFRA 21-1 비를 사용했을 때 민감도와 특이도가 가장 높았다[18]. 이어 대장암에서도 진단적 민감도를 높일 수 있는 지표로 기대할 수 있다. Nesterova 등[19]의 연구에서도 대장암 환자를 포함한 전체 암환자군과 건강대조군의 혈청 extracellular c-AMP-dependent protein kinase에 대한 항원과 항원-항체 복합체(anti-IgG autoantibody)를 측정하여 비교하였을 때 항원에 비해 anti-IgG autoantibody가 더 높은 수치를 보였고 더 높은 민감도와 특이도를 나타냈다. 따라서 종양표지자 항원만을 측정하는 현재의 건강검진에 향후 종양항원과 그 자가항체 면역복합체와의 비를 추가한다면 암 진단의 위양성, 위음성을 줄이는 데 도움을 받을 수 있을 것이다.

본 연구의 ROC 곡선분석에서는 CIC/CYFRA 21-1 비의 AUC가 CYFRA 21-1과 CIC 각각의 0.451과 0.562보다 증가하여 0.749로 나타났고, 이는 개별지표보다 CIC/CYFRA 21-1 비가 대장암 환자

선별능력을 높이는 것을 확인할 수 있었다. 혈장 CIC/CYFRA 21-1 비가 대장암 환자군에서 건강대조군보다 유의하게 높았다는 사실은 암과 연관된 단백질이 상승할 때 그보다 상대적으로 더 높은 속도로 자가항체가 생성됨을 유추할 수 있다[16].

본 연구의 제한점으로는 첫째, 대장암 환자군의 표본 수가 적어 추후 더 많은 대장암 환자를 대상으로 자료의 신뢰성을 높일 필요가 있다는 점을 들 수 있는데, 특히 0기와 1기 대장암 환자 수를 많이 확보하여 낮은 병기에서 환자군의 자가항체에 어떤 변화가 있는지 알아보고 선별검사로서의 유용성을 확인할 필요가 있다. 또한 증식성 용종(hyperplastic polyp), 계실질환, 관상선종(tubular adenoma) 등과 같은 대장 양성 질환군과의 비교에서 CIC/CYFRA 21-1 비의 대장암 선별능을 확인하는 추가적인 연구가 필요할 것이다. 둘째, 성인 건강대조군의 무작위 검체 수집과정에서 나이에 있어 대장암 환자군과 유의한 차이를 보였다는 점이다. 하지만 본 연구에서 대장암 환자군에서 세 가지 지표를 60세 이상과 60세 미만으로 나누어 보았을 때, 각 수치에서 유의한 차이를 보이지 않았으며(Table 3), 건강대조군에서도 차이를 보이지 않았다(CYFRA 21-1, $P=0.736$; CIC, $P=0.782$; CIC/CYFRA 21-1 비, $P=0.966$; 표 없음). 셋째, 본 연구에서는 CYFRA 21-1 하나의 종양표지자와 그에 대한 자가항체 면역복합체에 대해서만 연구하였는데, 이 결과를 이전 연구들을 통해 대장암 환자에서 유용한 것으로 알려진 종양표지자들과 비교하고[20], 추가적으로 복수의 종양표지자에 대한 자가항체 동시측정 연구가 필요하다는 점을 들

수 있다. 이전 여러 연구에서 시도되었던 여러 가지 종류의 자가항체 연구에서처럼 대장암에 대한 민감도, 특이도가 있는 종양표지자에 대하여 그 자가항체들까지 더 조사한다면 진단적 가치를 높일 수 있는 검사패널을 만들 수 있을 것이다[21]. 넷째, 본 연구에 포함된 환자들에서 자가항체 추적검사가 이루어지지 않아 치료에 따른 자가항체 변화나 예후와의 연관성에 대한 조사가 부족한 것을 들 수 있다. 일례로, NY-ESO-1의 자가항체의 경우 이 수치의 증가가 여러 종류의 암에서 종양부하량 증가를 반영하는 것으로 나타나기도 하지만, 또 어떤 경우에는 암의 진행과 함께 이 자가항체의 수치가 떨어지는 것을 볼 수 있었다[22].

결론적으로 이 연구에서는 CIC/CYFRA 21-1 비는 판정기준치 1.40에서 민감도 68%와 특이도 74.2%로 대장암 종양표지자로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 과학기술정보통신부 한국원자력의학원 연구운영비 지원사업(No. 505442020)의 지원을 받아 수행하였다. 본 연구에 사용된 인체자원은 한국원자력의학원 국가방사선혈액자원은행에서 제공받았다(KRB-2018-I013). 9G DNA chip 검사키트와 Biometrix Technology (BMT) reader를 제공해주신 (주)바이오메트릭스 테크놀로지에 감사의 뜻을 표한다.

REFERENCES

1. Jose J, Sunil PM, Madhavan Nirmal R, Varghese SS. CYFRA 21-1: an overview. *Oral Maxillofac Pathol J* 2013;4:368-71.
2. Lee JH. Clinical usefulness of serum CYFRA 21-1 in patients with colorectal cancer. *Nucl Med Mol Imaging* 2013;47:181-7.
3. Brechot JM, Chevret S, Nataf J, Le Gall C, Fretault J, Rochemaure J, et al. Diagnostic and prognostic value of Cyfra 21-1 compared with other tumour markers in patients with non-small cell lung cancer: a prospective study of 116 patients. *Eur J Cancer* 1997;33:385-91.
4. Molina R, Filella X, Auge JM, Fuentes R, Bover I, Rifa J, et al. Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis: comparison with the main clinical and pathological prognostic factors. *Tumour Biol* 2003;24:209-18.
5. Giovanella L, Ceriani L, Giardina G, Bardelli D, Tanzi F, Garancini S. Serum cytokeratin fragment 21.1 (CYFRA 21.1) as tumour marker for breast cancer: comparison with carbohydrate antigen 15.3 (CA 15.3) and carcinoembryonic antigen (CEA). *Clin Chem Lab Med* 2002;40:298-303.
6. Molina R, Filella X, Auge JM, Bosch E, Torne A, Pahisa J, et al. CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA. *Anticancer Res* 2005;25:1765-71.
7. Jeong S, Park Y, Cho Y, Kim YR, Kim HS. Diagnostic values of urine CYFRA21-1, NMP22, UBC, and FDP for the detection of bladder cancer. *Clin Chim Acta* 2012;414:93-100.

8. Aziz F, Smith M, Blackburn JM. Autoantibody-based diagnostic biomarkers: technological approaches to discovery and validation. In: Kahn WD, editor. Autoantibodies and cytokines. London: IntechOpen, 2018:159-87.
9. Von Kleist S, Burtin P. On the specificity of autoantibodies present in colon cancer patients. *Immunology* 1966;10:507-15.
10. Gold JM, Freedman SO, Gold P. Human anti-CEA antibodies detected by radioimmuno-electrophoresis. *Nat New Biol* 1972;239:60-2.
11. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:2420-4.
12. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982;30:403-8.
13. Soussi T. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 2000;60:1777-88.
14. Angelopoulou K, Stratis M, Diamandis EP. Humoral immune response against p53 protein in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1997;70:46-51.
15. Lubin R, Zalzman G, Bouchet L, Tredanel J, Legros Y, Cazals D, et al. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat Med* 1995;1:701-2.
16. Pedersen JW, Wandall HH. Autoantibodies as biomarkers in cancer. *Lab Med* 2011;42:623-8.
17. Negm OH, Hamed MR, Schoen RE, Whelan RL, Steele RJ, Scholefield J, et al. Human blood autoantibodies in the detection of colorectal cancer. *PLoS One* 2016;11:e0156971.
18. Song KS, Nimse SB, Warkad SD, Oh AC, Kim T, Hong YJ. Quantification of CYFRA 21-1 and a CYFRA 21-1-anti-CYFRA 21-1 autoantibody immune complex for detection of early stage lung cancer. *Chem Commun (Camb)* 2019;55:10060-3.
19. Nesterova M, Johnson N, Cheadle C, Cho-Chung YS. Autoantibody biomarker opens a new gateway for cancer diagnosis. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:398-403.
20. Lech G, Slotwinski R, Slodkowski M, Krasnodebski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol* 2016;22:1745-55.
21. O'Rourke DJ, DiJohnson DA, Caiazzo RJ Jr, Nelson JC, Ure D, O'Leary MP, et al. Autoantibody signatures as biomarkers to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate specific antigen. *Clin Chim Acta* 2012;413:561-7.
22. Zaenker P, Gray ES, Ziman MR. Autoantibody production in cancer: the humoral immune response toward autologous antigens in cancer patients. *Autoimmun Rev* 2016;15:477-83.